

DESARROLLO DE NUEVOS MARCADORES DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GLUTENINAS DE ALTO PESO MOLECULAR (HMW) EN TRIGO

A. Espí, M. Rodríguez-Quijano, J. M. Carrillo y P. Giraldo

Unidad de Genética. Departamento de Biotecnología. E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Madrid.
Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid

Palabras clave: calidad panadera, HMW-GS, *T. aestivum* ssp *vulgare* L., PCR.

Resumen

Las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) son las principales responsables de la calidad panadera del trigo (*T. aestivum* ssp *vulgare* L.). Su estudio se realiza por métodos electroforéticos en geles SDS-PAGE, habiéndose identificado así una gran cantidad de alelos distintos con diferente influencia en la calidad. Sin embargo, la correcta asignación de alelos puede ser a veces complicada usando sólo este método, por ello se están desarrollando marcadores basados en la secuencia de ADN que complementen el análisis electroforético y ayuden a la correcta discriminación alélica. En este trabajo se han desarrollado marcadores nuevos para diferenciar inequívocamente las subunidades 2⁺ vs 2* del locus *Glu-A1*, y, la 7 vs 7* y la 7 vs 13 del locus *Glu-B1*.

INTRODUCCIÓN

En el trigo blando, *Triticum aestivum* ssp *vulgare* L., las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) han mostrado tener una gran influencia en la calidad reológica de la masa (Payne et al., 1981). La síntesis de estas subunidades está controlada por los loci complejos *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*. Los tres loci muestran variación alélica, presentando dos, una o ninguna subunidad, en los geles SDS-PAGE. Los distintos alelos tienen distintos efectos en la calidad panadera del trigo (Rodríguez-Quijano y Carrillo, 1994) por lo que su correcta identificación es algo primordial a la hora de seleccionar materiales en un programa de mejora. La identificación mediante SDS-PAGE es un método sencillo, rápido y económico, pero puede plantear dificultades en la discriminación de alelos con una movilidad electroforética muy parecida y en la asignación de alelos nuevos. Por esta razón, es necesario complementar el análisis con otras técnicas más sensibles. A día de hoy, ya están en las bases de datos muchas secuencias de los genes de las HMW-GS y, con esta información se están desarrollando marcadores basados en la secuencia de ADN, fácilmente analizables por PCR, para muchas de las HMW-GS (Liu et al., 2008). En este trabajo se ha abordado la creación de nuevos marcadores por PCR para discriminar la subunidad 2⁺ de la 2* del locus *Glu-A1* y la 7 de la 7* del locus *Glu-B1*. Además se ha diseñado un marcador CAPS (*Cleavage Amplified Polymorphism Sequence*) para discriminar la subunidad 7 de la 13 del locus *Glu-B1*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la extracción del ADN se utilizó un método estándar con CTAB. Para el diseño de los cebadores específicos se utilizó el programa informático *Primer3* basándonos en los datos de las secuencias publicadas. Los materiales utilizados se detallan en la Tabla 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para diferenciar las subunidades 2' y 2* del locus *Glu-A1* y la 7 y 7* del locus *Glu-B1* se diseñaron cebadores que amplificaron regiones polimórficas entre ambos pares de subunidades. La presencia de una delección de 18pb en la secuencia de la subunidad 2' respecto de la 2* permitió la discriminación de los productos de amplificación en geles de agarosa al 3% y también en el caso de las subunidades 7 y 7* la presencia de una delección de 18pb en la primera permitió la discriminación entre ambas. Frecuentemente la electroforesis SDS-PAGE no ha permitido una correcta diferenciación entre estas HMW-GS, por lo que su diferente influencia en la calidad panadera tampoco está debidamente clarificada.

En el caso de las subunidades 7 y 13 del locus *Glu-B1*, su movilidad por electroforesis SDS-PAGE puede dar lugar a confusión, porque tienen peso molecular muy parecido. Al no existir polimorfismo de tamaño, ya que ambas subunidades tienen el mismo número de nucleótidos en su secuencia codificante, se diseñó un marcador CAPS aprovechando la existencia de una diana de restricción *TaqI* en la secuencia de la subunidad 7 ausente en la subunidad 13.

El uso de marcadores de ADN para las HMW-GS es un método fácil y rápido, complementario a los geles SDS-PAGE para aquellos casos de difícil asignación alélica así como para la selección asistida por marcadores de materiales en generaciones tempranas dentro de un programa de mejora.

REFERENCIAS

- Liu, S., Chao, S. and Anderson, J.A. 2008. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 118: 177-183.
- Payne, P.I., Holt, L.M. and Law C.N. 1981. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. Part I: allelic variation in subunits amongst varieties of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 60: 229-236.
- Rodríguez-Quijano M. y Carrillo J.M. 1994. Relación entre subunidades de gluteninas de alto peso molecular y fuerza del gluten en cultivares indígenas españoles de *Triticum aestivum* ssp *vulgare*. *Invest. Agr: Prote. Veg* 3: 327-339.

Tabla 1. Materiales utilizados para la discriminación de subunidades de gluteninas de alto peso molecular mediante PCR

Testigo	HMW -GS	Secuencia GenBank	Cebador F Cebador R	T ^a	Tamaño
'Cheyenne'	2*	M22208	TTTCATACTATCCAGGCCAAGC	56°C	100pb
'Ribeiro'	2'	DQ533690	GGTTGTTGCCATTGTCCTGA		
'Ch. Spring'	7	X13927	CCAACCTTCTTCACAGCAGTC	55°C	373pb
'Glenlea'	7*	DQ119142	GTCGGAGAAGCTTTTCATC		
'Ch. Spring'	7	DQ119142	GCCTCTGGACAACCTACAATGTG	56°C	223pb
'Lancota'	13	EF540764	GCAGGTATTCCCCAAAATATCA		

T^a: temperatura de anillamiento.